

早稲田大学大学院 理工学研究科

# 博 士 論 文 概 要

## 論 文 題 目

幹細胞の肝細胞誘導に伴う分子制御の包括的  
データプロセッシング

**Transcriptome Approaches Reveal Characteristics of Hepatic  
Differentiation of Stem Cells**

申 請 者

山本 雄介  
Yusuke Yamamoto

生命理工学専攻 分子生理学研究

2007 年 12 月

21世紀の先端医療として注目される再生医療の進歩は目覚ましく、胚性幹細胞（ES細胞）や成体臓器中に存在する組織幹細胞から様々な細胞への分化が基礎科学および臨床医学的側面から研究されている。軟骨や皮膚等の組織においてはすでに、その組織の再構築が可能になるまでに研究が進み、臨床応用が実現している。肝臓に関しても、肝不全に陥ったヒト疾患の根治的な治療への応用が求められている。本研究は、全能性を有するマウスES細胞と、可塑性を有するヒト間葉系幹細胞の肝細胞分化誘導系をモデルにして、細胞分化過程に起こる遺伝子発現の変化やシグナル経路の活性化について遺伝子発現を網羅的に解析し、幹細胞の全能性や可塑性を制御する分子機構の特性を明らかにする。

第1章では肝臓の構造とその発生段階について述べている。肝臓は肝細胞（肝実質細胞）、類洞内皮細胞、胆管上皮細胞、クッパー細胞などの様々な細胞によって構成される臓器で、肝細胞の含有率は約60%程度である。それらの細胞が複雑かつ規則的に配置されており肝小葉と呼ばれる構造を形成している。また、栄養素の処理、貯蔵、解毒、分解、排出などの数百にも及ぶ生理的な機能を有しており、生体に必須の臓器である。その発生過程においても研究が進んでおり、マウスでは8日胚に内胚葉の細胞が心筋中胚葉から分泌される因子によって9.5日胚前後に肝芽へと分化が進行し、その後、内皮細胞との相互作用や血液細胞からのサイトカインによって成熟化が進み肝臓が形成されていく。肝臓の再生を目指し、様々な幹細胞を材料にした肝細胞の分化誘導に関する多くの研究が報告されているが、幹細胞の分化制御に関与する一連の遺伝子の発現メカニズムについて未だ不明な点が多い。肝細胞の分化過程における分子機序を明らかにすることで、多分化能を有する幹細胞から肝細胞を正確かつ高効率に分化させることが実現できると考えられる。以下、各章ごとに研究の詳細を述べている

本研究に先立ち、四塩化炭素処理をした肝不全マウスの肝臓にES細胞を移植することで、ES細胞は障害肝に定着し、肝細胞特異的遺伝子であるアルブミンを発現する細胞に分化することが既に報告された(Yamamoto H *et al.*, 2003, Hepatology)。細胞形態や他の遺伝子発現特性からも、その細胞はマウス肝細胞の性質を持つことが同定された。四塩化炭素処理を施したマウスの肝臓の再生において発現が上昇する遺伝子群を分析した結果、*in vitro*においてES細胞をアルブミン陽性細胞へと分化誘導する因子の組み合わせ(肝細胞増殖因子・線維芽細胞増殖因子1・線維芽細胞増殖因子4)が同定された。これらの増殖因子群を添加することで未分化状態を保っているマウスES細胞から分化誘導された肝細胞は約30%にも達し、移植可能な細胞であることが確認された(Teratani T *et al.*, 2005, Hepatology)。さらにこの手法を改変することで、脂肪組織由来ヒト間葉系幹細胞からもアルブミン陽性肝細胞が分化誘導され、形態的・機能的にも肝細胞様の性状を有する細胞の出現が確認された(Banas A *et al.*, 2007, Hepatology)。

そのために、発現遺伝子を詳細かつ包括的にマイクロアレイ法を用いて解析し、

マウスES細胞および脂肪組織由来ヒト間葉系幹細胞に由来する肝細胞の特性を明らかにした。未分化な幹細胞と正常肝臓（マウスおよびヒト）の発現プロファイルと比較した結果、薬剤代謝に関わる因子であるチトクロームP450や、脂質代謝に関わる因子アポリポプロテインなどの、さらに肝臓特異的に発現する転写因子などの肝細胞特有の遺伝子が誘導されていることが明らかになった。増殖因子添加培養下に発現変化を認めた遺伝子群のクラスタリング解析からも、両幹細胞由来肝細胞の発現プロファイルは未分化な幹細胞とは明らかに異なり、正常肝臓のそれと酷似していることが判明した。

次に遺伝子のオントロジー解析によりマウスES細胞とヒト間葉系幹細胞に由来する肝細胞において、増殖因子による処理を行うことで肝機能に関わる多くの遺伝子群の出現率が有意に変化することが確認された。特にヒト間葉系幹細胞に由来する肝細胞ではより多くの肝機能に関わる遺伝子が誘導されることが明らかになった。そこで、ヒト間葉系幹細胞由来肝細胞を対象にしてより検出感度の高いマイクロアレイ解析を展開し、分化に伴う遺伝子のシグナルパスウェイの比較検討を行った。その結果、間葉系幹細胞由来肝細胞では補体の活性化や血液凝固因子が顕著に誘導されており、ヒト肝機能の特性を有することを認めた。以上、ES細胞・間葉系幹細胞からともに肝機能に関わる分泌蛋白質や代謝関連の遺伝子の誘導が起こり、正常肝臓・肝細胞の遺伝子発現プロファイルと同等の特性を持つ細胞が得られることを検証した。

次に、幹細胞から肝細胞へ分化する過程の分子メカニズムの解明を進めた。まず、ES細胞では、マイクロアレイの解析から肝細胞への分化過程の初期・中期・後期に働く遺伝子の発現を比較すると、種類や発現量ともに大幅に異なっていることが示された。ES細胞からの肝細胞分化過程は10日間を要する。経時的にRNAを抽出し、Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法によって $\alpha$ フェトプロテインとアルブミンに加え、成熟肝細胞で発現するTryptophan2, 3-oxygenase(TDO2)の発現を調べた。その結果 $\alpha$ フェトプロテインの発現は分化初期に上昇し、中期になると発現が下がった。続いてアルブミンの発現が上昇し、分化終期にはTDO2の発現が上昇し、このような遺伝子発現は成体における遺伝子発現と同様であることを認めた。そこで、肝臓・内胚葉に選択的に発現する転写因子についてRT-PCR法による発現解析を行った。分化初期ではGATA-binding protein (GATA)4、GATA6、Hepatocyte nuclear factor (HNF)1 $\alpha$ 、HNF1 $\beta$ 、HNF3 $\alpha$ 、HNF3 $\beta$ 、HNF3 $\gamma$ 、HNF4 $\alpha$ 遺伝子、分化中期ではHNF1、CCAAT/Enhancer-Binding Protein(C/EBP) $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 遺伝子の発現が上昇した。その結果は分化初期においては内胚葉への分化を制御する転写因子の活性化が必須であることを示す。そこでsmall interference RNA (siRNA)干渉系を用いて*in vitro*で内胚葉分化に重要である転写因子HNF3 $\beta$ の発現を抑制することでES細胞から肝細胞へ分化する過程において内胚葉系細胞への分化抑制を試みた。ES細胞からの分化初期にリポフ

エクシオン法によるHNF3 $\beta$  siRNAの導入を行い、内胚葉系の細胞への誘導の抑制を行った。その結果、分化誘導終了時点でアルブミン陽性細胞への分化誘導効率は減少し、肝細胞分化が阻害されたことが明らかになった。この時、肝細胞特異的発現分子トランスサイレチンを含む3種類の遺伝子の発現は減少していた。内胚葉分化を阻害することによって肝細胞分化も同様に抑制されたことから、肝細胞誘導過程においてES細胞は内胚葉の細胞への分化を経て肝細胞に誘導されると結論付けた。さらに、マウスES細胞から分化過程において肝臓の組織幹細胞である肝幹細胞が出現しているかを確認するためにRT-PCR法によって4種の遺伝子発現を調べた。その結果、分化中期に肝幹細胞に発現するDLKやCytokeratin19の発現が認められたことから、マウスES細胞からの肝細胞分化において肝幹細胞様の細胞が出現する可能性が示された。

一方、未分化なヒト間葉系幹細胞は線維芽細胞様の形態を呈すのに対し、肝細胞へ分化した後は上皮細胞様の細胞形態を示した。遺伝子発現の観点からみても、未分化なヒト間葉系幹細胞では間質細胞に選択的に発現するN-カドヘリンの発現量が高く、上皮系細胞で発現するE-カドヘリンの発現は低い。これとは対照的に分化した肝細胞ではN-カドヘリンの発現は低下し、E-カドヘリンの発現が上昇した。さらに肝細胞分化において上皮-間葉転換に関わる因子であるTwistやSnailの発現が低下していることを見出した。以上は、間質系の細胞である間葉系幹細胞から上皮系の細胞である肝細胞への分化の過程において、上皮-間葉転換の逆の現象である間葉-上皮転換が起き、それが肝細胞への分化転換を起こす要因の一つであることを示す。

最終章では本研究の結論と展望について述べている。マウスES細胞とヒト間葉系幹細胞の2種の幹細胞が共に遺伝子発現の制御を受けて肝細胞へと分化する能力を持ち、かつその過程の全容を明らかにした。しかし、その分化様式は由来の異なる幹細胞から派生する肝細胞では異なることを見出した。すなわち、全能性を有するES細胞では内胚葉を経て肝細胞へと分化するという本来の発生過程を模倣した分化様式であるのに対し、間葉系幹細胞は間葉-上皮転換の遺伝子発現の変化に裏打ちされた中胚葉から内胚葉への転換を経て肝細胞へ誘導される。

幹細胞から肝細胞へ分化する過程を解明することによって、医療分野での貢献が可能になる。同時に、幹細胞特有の性質・可塑性を理解する上で基礎生物学的にも非常に重要なことである。特にがん化と伴うことなく、高い効率で肝細胞を分化誘導する手法の開発に不可欠な知見となる。再生医療への導入を視野に入れた際、脂肪組織由来間葉系幹細胞は低侵襲的に得ることができ自家移植が可能である点や、本研究成果による肝機能の比較検討より、肝不全の治療への応用により有効であると期待している。重篤な肝不全の治療には肝移植を用いるしかないが、幹細胞由来の肝細胞を根治治療として再生医療分野で移植することが可能になればドナー不足は解消し、医学のみならず社会的にも大きな成果となる。

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 山本 雄介 印

(2008 年 2 月現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○ 1. A comparative analysis of transcriptome and signal pathway in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. <i>FEBS J</i> (2008) 印刷中 Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T.</p> <p>○ 2. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from murine embryonic stem cells. <i>Hepatology</i>, 42: 558-67, (2005) Yamamoto Y, Teratani T, Yamamoto H, Quinn G, Murata S, Ikeda R, Kinoshita K, Matsubara K, Kato T, Ochiya T.</p> <p>3. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. <i>Hepatology</i>. 46: 219-228, (2007). Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T.</p> <p>4. Liver cells from embryonic stem cells. In: Pediatric Gastroenterology 2004-Reports from the 2nd World Congress of Pediatric Gastroenterology, <i>Hepatology and Nutrition</i>. Italy, Medimond S.r.l., 187-193, (2004) Ochiya T, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T.</p>
総説	<p>1. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. Review, <i>Developmental Dynamics</i>. 236: 3228-3241, (2007) Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T.</p> <p>2. バイオ人工肝臓の新しい細胞ソースとしてのステム細胞の評価 再生医療 8月号 メディカルレビュー社 401-407 (2006) 山本雄介、Agnieszka Banas、寺谷工、落谷孝広</p> <p>3. 再生医療における肝再生の現状－幹細胞からの肝細胞への分化誘導と肝障害治療への展望 P669-673 化学と生物 10 (2006) 寺谷工、山本雄介、落谷孝広</p> <p>4. 再生医療シリーズ『28』研究用ヒト細胞ソースとしての間葉系幹細胞の可能性 P419(23)-431(35) Organ Biology Vol. 13 No.4 (2006)別冊 寺谷工、山本雄介、落谷孝広</p>
講演	<p>1. Adipose tissue-derived stem cells as a source of hepatocytes: genetic and functional studies. The 5<sup>th</sup> annual meeting of IFATS 2007 Oct. Indianapolis Agnieszka Banas, Yusuke Yamamoto, Makoto Tokuhara, Takumi Teratani, Hitoshi Okochi, Takahiro Ochiya.</p> <p>2. Cancer patient's own adipose tissue mesenchymal stem cells as a source for stem cell-based therapy for liver cancer. The 66<sup>th</sup> annual meeting of the Japan Cancer Association, 2007 Oct. Yokohama Agnieszka Banas, Yusuke Yamamoto, Makoto Tokuhara, Takumi Teratani &amp; Takahiro Ochiya.</p> <p>3. Transcriptome Profiling to define the Hepatic Differentiation of Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Gene Pathway 第4回 肝細胞医生物研究会 2007年4月 山本雄介、バナス アグネス、寺谷工、落谷孝広</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>4. Human adipose tissue-derived stem cells as a source of functional hepatocytes.第6回 日本再生医療学会学術総会 2007年3月 横浜 バナス アグネス、徳原 真、寺谷工、<u>山本雄介</u>、大河内仁志、落谷孝広</p> <p>5. ヒト間葉系幹細胞由来肝細胞を用いた肝疾患治療に対する評価 第65回 日本癌学会学術総会 2006年9月 横浜 寺谷工、<u>山本雄介</u>、バナス アグネス、クイン・ギャリー、玉谷卓也、落谷孝広</p> <p>6. 機能的肝細胞のソースとしての脂肪組織由来幹細胞の有用性 第65回 日本癌学会学術総会 2006年9月 横浜 バナス アグネス、徳原真、寺谷工、クイン・ギャリー、<u>山本雄介</u>、落谷孝広</p> <p>7. Transcriptome Analysis to Define the Hepatic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cell. Gordon Research Conference-Molecular cell biology 2006 Jul. Tilton <u>Yusuke Yamamoto</u>, Takumi Teratani, Shigenori Murata, Kenichi Matsubara, Takashi Kato, Takahiro Ochiya</p> <p>8. Transcriptome profiling of hepatic differentiation from mesenchymal stem cell. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress 2006 Jun. Kyoto <u>Yusuke Yamamoto</u>, Takumi Teratani, Shigenori Murata, Kenichi Matsubara, Takashi Kato, Takahiro Ochiya</p> <p>9. 移植医療としての間葉系幹細胞由来ヒト肝細胞の評価 第5回日本再生医療学会 2006年3月 岡山 寺谷 工、<u>山本雄介</u>、Gary Quinn、Agnes Banas、玉谷卓也、落谷孝広</p> <p>10. Human adipose stem cells as a source of functional hepatocytes 第5回日本再生医療学会 2006年3月 岡山 Agnes Banas、徳原真、寺谷 工、Gary Quinn、<u>山本雄介</u>、大河内仁志、落谷孝広</p> <p>11. ES細胞のin vitro 肝細胞分化誘導系における肝幹細胞の探索第 28回日本分子生物学会 2005年12月 福岡 <u>山本雄介</u>、寺谷工、野川菜美、石田貴子、加藤尚志、落谷孝広</p> <p>12. Recapitulation of <i>in vivo</i> Gene Expression During Hepatic Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells Society of Developmental Biology 64<sup>th</sup> ANNUAL MEETING 2005 Jul. San Francisco <u>Yusuke Yamamoto</u>, Takumi Teratani, Takashi Kato, Takahiro Ochiya</p> <p>13. ES細胞の肝細胞分化に伴う遺伝子発現解析 第4回日本再生医療学会 2005年3月 大阪 <u>山本雄介</u>、寺谷工、加藤尚志、落谷孝広</p> <p>14. ヒト間葉系幹細胞由来肝細胞の新たな展開 第4回日本再生医療学会 2005年3月 大阪 落谷孝広、<u>山本雄介</u>、寺谷 工</p> <p>15. ES細胞の肝細胞分化及び成熟化を制御する分子メカニズムの解析 第27回日本分子生物学会 2004年12月 神戸 <u>山本雄介</u>、寺谷 工、村田成範、池田理恵子、木下健司、松原謙一、加藤尚志、落谷孝広</p> <p>16. Liver Cells from Embryonic Stem Cells the 2<sup>nd</sup> World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition E703R9075 Paris, 2004 Jul Takahiro Ochiya, Gary Quinn, <u>Yusuke Yamamoto</u>, Takumi Teratani</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
著書	<p>17. ES 細胞から肝細胞への分化に関する核内転写因子の解析第 26 回日本分子生物学会（ワークショップ） 2003 年 12 月 神戸  <u>山本雄介</u>、寺谷工、加藤尚志、落谷孝広</p> <p>1. "Stem cells into liver"--basic research and potential clinical applications.  Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 585, 3-17, (2006)  Banas A, Quinn G, <u>Yamamoto Y</u>, Teratani T, Ochiya T</p> <p>2. Plasticity of adult stem cells into liver.  Current Research in Hepatology. P1-18, (2007)  <u>Yamamoto Y</u>, Banas A, Kato T, Ochiya T.</p>
その他	<p>1. レーザートラッピング技術を駆使した組織ナノデバイスの構築と応用  バイオテクノロジージャーナル 3, 4 月 羊土社 P160-164 (2005)  <u>山本雄介</u>、寺谷工、落谷孝広</p> <p>2. Laser-manipulated Cell Patterning on a Micro-device for Tissue Engineering. Submitted (2007)  <u>Yamamoto Y</u>, Teratani T, Matsumoto Y, Hayashi K, Oh I, Sato S, Munekane M, Masuhara H, Kato T, Ochiya T.</p> <p>3. RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. Revised (2007)  Honma K, Iwao-Koizumi K, Takeshita F, <u>Yamamoto Y</u>, Yoshida T, Nishio K, Nagahara S, Kato K, Ochiya</p> <p>4. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells.  <i>Diabetologia</i>. 49:2948-2958. (2006)  Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, <u>Yamamoto Y</u>, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G.</p> <p>5. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation  <i>FASEB J</i>. 20:1484-1485. (2006)  Kosaka N, Kodama M, Sasaki H, Takeshita F, <u>Yamamoto Y</u>, Sakamoto H, Kato T, Terada M, Ochiya T.</p> <p>6. Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell-derived hepatocytes with hyaluronan sponge.  <i>Cell Transplant</i>. 14:629-635. (2005)  Teratani T, Quinn G, <u>Yamamoto Y</u>, Sato T, Yamanokuchi H, Asari A, Ochiya T.</p> <p>7. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in <del>Proc</del> <i>Natl Acad Sci U S A</i>. 102:12177-12182, (2005)  Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, <u>Yamamoto Y</u>, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T.</p> <p>8. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo.  <i>Nucleic Acids Res</i>. 32:e109, (2004)  Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, <u>Yamamoto Y</u>, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M, Ochiya T. その他講演 13 回</p>